

Laurent PRADIER, Pascal BARNEOUD, Pia DELAERE, Michel PERRICAUDET and
Emmanuelle VIGNE

RECOMBINANT ADENOVIRUSES CODING FOR BRAIN-DERIVED
NEUROTROPHIC FACTOR (BDNF)

U.S. National Stage of PCT/FR95/00250

English Translation of the International Application
(43 pages text; 2 sheets drawings)

Atty. Docket No. ST94014-US

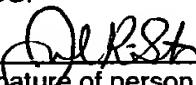
CERTIFICATE OF MAILING (37 CFR § 1.10)

EH305520964 US
"Express Mail" Mailing Number

17 September 1996
Date of Deposit

I hereby certify that this paper (along with any referred to as being attached or enclosed) is being deposited with the United States Postal Service "Express Mail Post Office to Addressee" service under 37 CFR 1.10 on the date indicated above and is addressed to Box PCT, Assistant Commissioner for Patents, Washington, DC 20231, Att: EO/US.

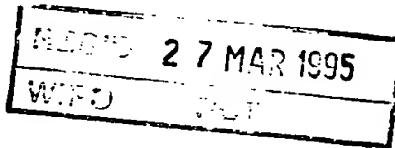
Julie K. Smith
(Type or print name of person mailing paper)


(Signature of person mailing paper)



INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

08/7/6209

PRIORITY DOCUMENT

BREVETS D'INVENTION

CERTIFICATS D'UTILITÉ - CERTIFICATS D'ADDITION

Copie officielle

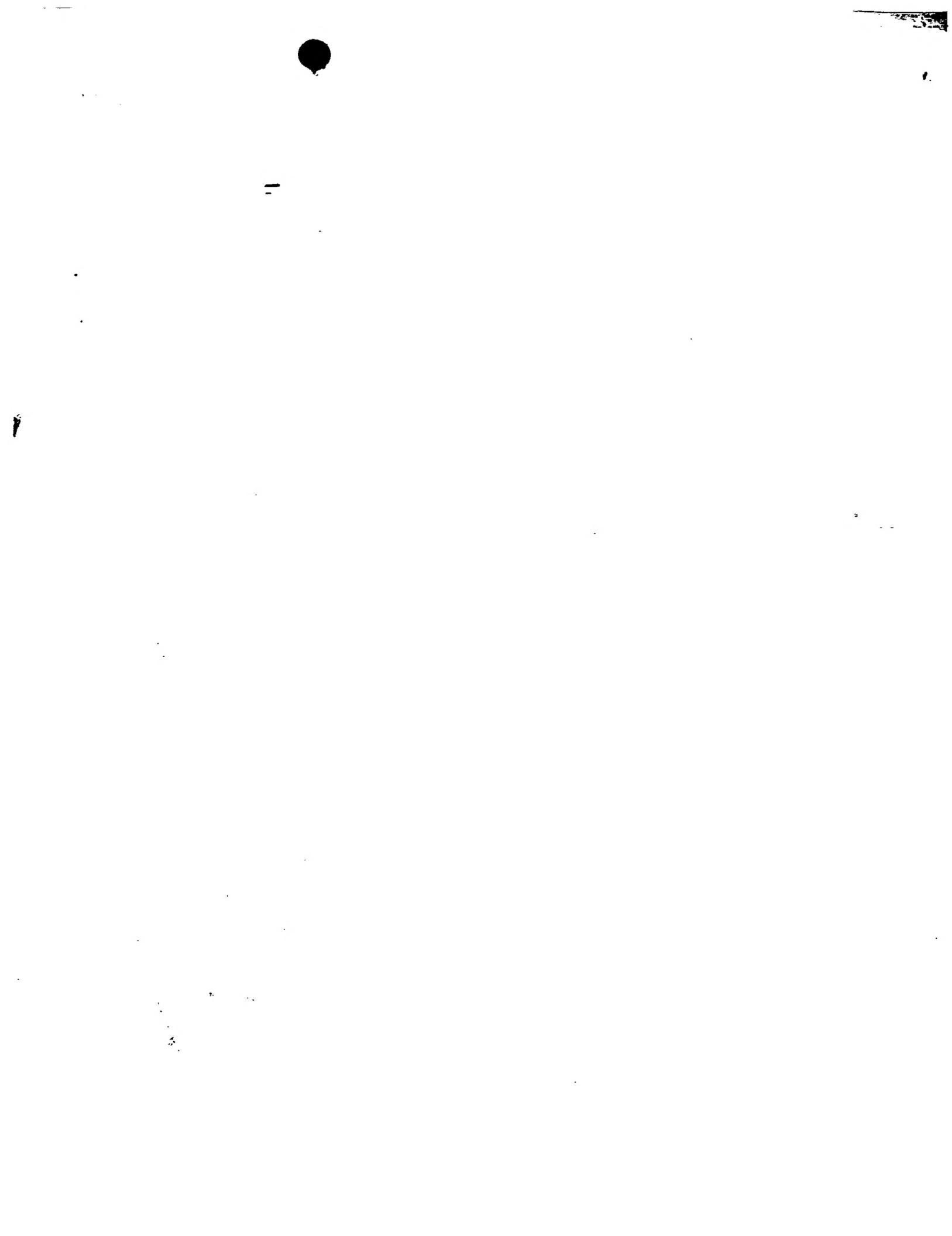
Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme, d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

- 7 FEV. 1995
Fait à Paris le _____

*Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef de Division*

Yves CAMPENON





REQUETE

EN DÉLIVRANCE D'UN
TITRE DE PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE *

<input checked="" type="checkbox"/>	BREVET D'INVENTION
<input type="checkbox"/>	CERTIFICAT D'UTILITÉ
<input type="checkbox"/>	DEMANDE DIVISIONNAIRE
<input type="checkbox"/>	TRANSFORMATION D'UNE DEMANDE DE BREVET EUROPÉEN

2 OPTIONS OBLIGATOIRES au moment du dépôt (sauf pour le certificat d'utilité)

LE DEMANDEUR REQUIERT
L'ESTABLISSEMENT DIFFÉRENT
DE L'AVIS DOCUMENTAIRE
 OUI
 NON
SI L'OPTION CHOISIE EST NON ET
SI LE DEMANDEUR EST UNE
PERSONNE PHYSIQUE, IL
REQUIERT LE PAIEMENT
ÉCHELONNÉ DE LA REDEVANCE
D'AVIS DOCUMENTAIRE
 OUI
 NON

NATURE

NUMÉRO

DATE DE LA DEMANDE INITIALE

DATE DE REMISE DES PIÈCES	18 MAR 1994
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	94 03191 -
CODE POSTAL DU LIEU DE DÉPÔT	75

DATE DE DÉPÔT	18 MARS 1994
4 NUMÉRO DU POUVOIR PERMANENT	15 janvier 1991

3 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE A QUI TOUTE LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADDRESSEE

RHONE-POULENC RORER SA
DIRECTION Brevets
20, ave. Raymond Aron
92165 Antony Cedex

5 RÉFÉRENCE DU CORRESPONDANT
ST940146 TÉLÉPHONE DU CORRESPONDANT
40 91 70 36

7 TITRE DE L'INVENTION

VIRUS RECOMBINANTS, PRÉPARATION ET UTILISATION EN
THERAPIE GENIQUE

8 DEMANDEUR(S) : Nom et Prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination et forme juridique

RHONE-POULENC RORER SA
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
INSTITUT GUSTAVE ROUSSY

N° SIREN.

9 ADRESSE(S) COMPLÈTE(S)

20 ave. Raymond Aron, 92160 Antony
3 Rue Michel Ange, 75016 Paris
XXXXXXX
39 Rue Camille Desmoulins , 94800 VILLEJUIF

PAYS

France

10 NATIONALITÉ(S)

Française

11 INVENTEUR(S)

LE DEMANDEUR EST L'UNIQUE
INVENTEUR
 OUI
 NON
SI LE DEMANDEUR EST UNE PERSONNE
PHYSIQUE NON IMPÔSABLE, IL
REQUIERT OU A REQUIS LA RÉDUCTION
DES REDEVANCES*
 OUI
 NON

REDEVANCES VERSÉES

 DE DÉPÔT
 D'AVIS DOCUMENTAIRE

 DE REVENDICATION DE PRIORITÉ

 DE REVENDICATION (à partir de la 11e)
13 DÉCLARATION DE PRIORITÉ
OU REQUETE DU BÉNÉFICE DE
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE
DEMANDE ANTIÉRIEURE

PAYS D'ORIGINE

DATE DE DÉPÔT

NUMÉRO

14

DIVISIONS

ANTÉRIEURES À LA
PRÉSENTE DEMANDE

N°

N°

N°

N°

15 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
NOM ET QUALITÉ DU SIGNATAIRE
RHONE-POULENC RORER SA
Fondé de Pouvoir

Philippe BECKER

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

División Administrativa de los Brevetes

ST 94014

Nº d'enregistrement national

94 03191

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Titre de l'invention :

VIRUS RECOMBINANTS, PRÉPARATION ET UTILISATION EN THERAPIE GENIQUE

Le (s) soussigné (s)

RHÔNE-POULENC RORER SA, 20 Ave. Raymond Aron, 92160 ANTONY

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE, 3 rue Michel Ange, 75016 PARIS

INSTITUT GUSTAVE ROUSSY, 39 rue Camille Desmoulins, 94800 VILLEJUIF

désigne (nt) en tant qu'inventeur (s) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

PRADIER Laurent - 5 bis rue d'Alésia, 75014 PARIS

BARNEOUD Pascal - 1 avenue Anatole France, 94600 CHOISY LE ROI

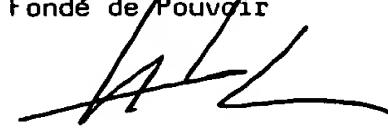
DELAERE Pia - 108 bis Boulevard Auguste Blanqui, 75013 PARIS

PERRICAUDET Michel - 31 rue de Chartres, 28320 ECROSNES

VICNE Emmanuelle - 60 rue Jean Le Galleu, 94200 IVRY SUR SEINE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire Antony, le 18 mars 1994
RHÔNE-POULENC RORER SA
Fondé de Pouvoir



Philippe BECKER

ORIGINAI

**VIRUS RECOMBINANTS. PREPARATION ET UTILISATION
EN THERAPIE GENIQUE**

La présente invention concerne des vecteurs recombinants d'origine virale et leur utilisation pour le traitement et/ou la prévention des maladies neurodégénératives. Plus particulièrement, elle concerne des adénovirus recombinants comportant une séquence d'ADN codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF, "brain-derived neurotrophic factor"). L'invention concerne également la préparation de ces vecteurs, les compositions pharmaceutiques les contenant et leur utilisation thérapeutique, notamment en thérapie génique.

Les maladies neurodégénératives représentent une large part des dépenses de santé dans les pays occidentaux, part qui ne cesse de s'accroître suite au vieillissement de la population. Au titre de ces affections, on peut citer notamment la maladie d'Alzheimer, le maladie de Parkinson, la chorée de Huntington, la sclérose latérale amyotrophique, etc. Les signes pathologiques et l'étiologie de ces maladies sont fort variés, mais toutes ces maladies résultent d'une perte progressive de cellules neuronales dans le système nerveux central, parfois au sein de structures très localisées comme la substance noire dans la maladie de Parkinson. Bien que certains traitements pharmacologiques palliatifs soient déjà disponibles, leurs effets sont relativement limités. La présente invention décrit une approche thérapeutique nouvelle, particulièrement avantageuse pour le traitement de ces maladies. Plus particulièrement, la présente invention décrit des vecteurs permettant de promouvoir directement la survie des cellules neuronales impliquées dans ces pathologies, par expression efficace et localisée de certains facteurs trophiques.

Les facteurs trophiques sont une classe de molécules ayant des propriétés de stimulation de la croissance neuritique ou de la survie des cellules nerveuses. Le premier facteur possédant des propriétés neurotrophiques, le NGF ("Nerve Growth Factor"), a été caractérisé il y a une quarantaine d'années (pour revue, voir Levi-Montalcini et Angelletti, Physiol. Rev. 48 (1968) 534). Ce n'est que récemment que d'autres facteurs neurotrophiques ont été identifiés, et notamment le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) (Thoenen, Trends in NeuroSci. 14 (1991) 165). Le BDNF est une protéine de 118 acides aminés et de poids moléculaire 13,5 kD. In vitro, le BDNF stimule la formation de neurites et la survie en culture des neurones ganglionnaires de la rétine, des motoneurones de la moelle épinière, des

- neurones cholinergiques du septum ainsi que des neurones dopaminergiques du mésencéphale (revue par Lindsay in Neurotrophic Factors, Ed, (1993) 257, Academic Press). Toutefois, bien que ses propriétés soient intéressantes, l'application thérapeutique du BDNF se heurte à différents obstacles. En particulier, l'absence de
5 biodisponibilité du BDNF limite toute utilisation thérapeutique. Par ailleurs, il n'existe pas de moyens efficaces permettant de délivrer le BDNF de manière durable et localisée à certaines régions désirées de l'organisme. Enfin, il est essentiel que le BDNF délivré soit actif et puisse exercer une activité thérapeutique *in vivo*.
- 10 La présente invention apporte une solution particulièrement avantageuse à ces problèmes. La présente invention réside en effet dans la mise au point de vecteurs particulièrement efficaces pour délivrer *in vivo* et de manière localisée, des quantités thérapeutiquement actives de BDNF. Dans la demande copandante n° PCT/EP93/02519, il a été montré que les adénovirus pouvaient être utilisés pour le
15 transfert de gènes *in vivo* dans le système nerveux. La présente invention concerne des constructions nouvelles, particulièrement adaptées et efficaces pour le transfert d'un gène spécifique dans le système nerveux. Plus particulièrement, la présente invention concerne un adénovirus recombinant comprenant une séquence d'ADN codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF), sa préparation, et
20 son utilisation pour le traitement et/ou la prévention des maladies neurodégénératives.

La demanderesse a maintenant montré qu'il est possible de construire des adénovirus recombinants contenant une séquence codant pour le BDNF, d'administrer ces adénovirus recombinants *in vivo*, et que cette administration permet une expression stable et localisée de quantités thérapeutiquement actives de BDNF *in vivo*, et en particulier dans le système nerveux, et sans effet cytopathologique. Les propriétés particulièrement avantageuses des vecteurs de l'invention découlent notamment de la construction utilisée (adénovirus défectif, délesté de certaines régions virales), du promoteur utilisé pour l'expression de la séquence codant pour le BDNF (promoteur viral ou tissu-spécifique de préférence), et des méthodes d'administration
25 dudit vecteur, permettant l'expression efficace et dans les tissus appropriés du BDNF. La présente invention fournit ainsi des vecteurs viraux utilisables directement en thérapie génique, particulièrement adaptés et efficaces pour diriger l'expression du BDNF *in vivo*. La présente invention offre ainsi une nouvelle approche
30 particulièrement avantageuse pour le traitement et/ou la prévention des maladies neurodégénératives.

Un premier objet de l'invention réside donc dans un adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADN codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) ou un dérivé de celui-ci.

5 L'invention a également pour objet l'utilisation d'un tel adénovirus recombinant défectif pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement ou à la prévention des maladies neurodégénératives.

Le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) produit dans le cadre de la présente invention peut être le BDNF humain ou un BDNF animal. La séquence d'ADN codant pour le BDNF humain et pour le BDNF de rat a été clonée et 10 séquencée (Maisonpierre et al., Genomics 10 (1991) 558), ainsi que notamment la séquence codant pour le BDNF de porc (Leibrock et al., Nature 341 (1989) 149). Préalablement à leur incorporation dans un vecteur adénovirus selon l'invention, ces séquences sont avantageusement modifiées, par exemple par mutagénèse dirigée, en particulier pour l'insertion de sites de restriction appropriés. Les séquences décrites 15 dans l'art antérieur ne sont en effet pas construites pour une utilisation selon l'invention, et des adaptations préalables peuvent s'avérer nécessaires, pour obtenir des expressions importantes (voir exemple 1.2.). Dans le cadre de la présente invention, on préfère utiliser une séquence d'ADN codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau humain (hBDNF). Par ailleurs, comme indiqué ci-avant, il est également possible d'utiliser une construction codant pour un dérivé du 20 BDNF, en particulier un dérivé du BDNF humain. Un tel dérivé comprend par exemple toute séquence obtenue par mutation, délétion et/ou addition par rapport à la séquence native, et codant pour un produit conservant l'une au moins des propriétés biologiques du BDNF (effet trophique et/ou différentiateur). Ces modifications 25 peuvent être réalisées par les techniques connues de l'homme du métier (voir techniques générales de biologie moléculaire ci-après et exemple 2). L'activité biologique des dérivés ainsi obtenus peut ensuite être aisément déterminée, comme indiqué notamment dans l'exemple 3.. Les dérivés au sens de l'invention peuvent également être obtenus par hybridation à partir de banques d'acides nucléiques, en 30 utilisant comme sonde la séquence native ou un fragment de celle-ci.

Ces dérivés sont notamment des molécules ayant une plus grande affinité pour leurs sites de fixation, des séquences permettant une expression améliorée *in vivo*, des molécules présentant une plus grande résistance aux protéases, des

molécules ayant une efficacité thérapeutique plus grande ou des effets secondaires moindres, ou éventuellement de nouvelles propriétés biologiques.

Parmi les dérivés préférés, on peut citer plus particulièrement les variants naturels, les molécules dans lesquelles un ou plusieurs résidus ont été substitués, les dérivés obtenus par délétion de régions n'intervenant pas ou peu dans l'interaction avec les sites de liaison considérés ou exprimant une activité indésirable, et les dérivés comportant par rapport à la séquence native des résidus supplémentaires, tels que par exemple un signal de sécrétion et/ou un peptide de jonction. De manière particulièrement avantageuse, la séquence de la présente invention code pour le BDNF précédé de la région pro native (proBDNF).

Par ailleurs, il est particulièrement important pour une meilleure mise en oeuvre de la présente invention que la séquence utilisée contienne également un signal de sécrétion permettant de diriger le BDNF synthétisé dans les voies de sécrétion des cellules infectées, de manière à ce que le BDNF synthétisé soit libéré dans les compartiments extracellulaires et puisse activer ses récepteurs. Le signal de sécrétion est avantageusement le propre signal du BDNF. Mais il peut également s'agir d'un signal de sécrétion hétérologue ou même artificiel.

La séquence d'ADN codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau utilisée dans le cadre de la présente invention peut être un ADNc, un ADN génomique (ADNg), ou une construction hybride consistant par exemple en un ADNc dans lequel seraient insérés un ou plusieurs introns. Il peut également s'agir de séquences synthétiques ou semisynthétiques. Il est à noter que dans la séquence génomique codant pour le BDNF, les introns sont localisés dans les régions non codantes. De manière particulièrement avantageuse, on utilise un ADNc ou un ADNg. En particulier, l'utilisation d'un ADNg peut permettre une meilleure expression dans les cellules humaines.

Dans un premier mode de réalisation de l'invention, l'adénovirus comprend donc une séquence d'ADNc codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF). Dans un autre mode de réalisation préféré de l'invention, l'adénovirus comprend une séquence d'ADNg codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF). Avantageusement, la séquence d'ADN code pour le proBDNF et, de préférence, le préproBDNF.

Ayantageusement, la séquence codant pour le BDNF est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans les cellules nerveuses. Préférentiellement, il s'agit de signaux d'expression hétérologues, c'est-à-dire de signaux différents de ceux naturellement responsables de l'expression du BDNF. Il peut s'agir en particulier de séquences responsables de l'expression d'autres protéines, ou de séquences synthétiques. Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus, y compris l'adénovirus utilisé. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs E1A, MLP, CMV, LTR-RSV, etc. En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique. Il peut en effet être particulièrement intéressant d'utiliser des signaux d'expression actifs spécifiquement ou majoritairement dans les cellules nerveuses, de manière à ce que la séquence d'ADN ne soit exprimée et ne produise son effet que lorsque le virus a effectivement infecté une cellule nerveuse. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs de l'énolase neurone-spécifique, de la GFAP, etc.

Dans un premier mode de réalisation particulier, l'invention concerne un adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNc codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau humain (hBDNF) sous le contrôle du promoteur LTR-RSV.

Dans un autre mode de réalisation particulier, l'invention concerne un adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNg codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau humain (hBDNF) sous le contrôle du promoteur LTR-RSV.

La demanderesse a en effet montré que le promoteur LTR du virus du sarcome de rous (RSV) permettait une expression durable et importante du BDNF dans les cellules du système nerveux, notamment central.

Toujours dans un mode préféré, l'invention concerne un adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADN codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau humain (hBDNF) sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression majoritaire dans le système nerveux. Un mode particulièrement préféré de mise en oeuvre de la présente invention réside dans un adénovirus recombinant défectif comprenant les séquences ITR, une séquence permettant l'encapsidation, une séquence d'ADN codant pour le facteur

neurotrophique dérivé du cerveau humain (hBDNF) ou un dérivé de celui-ci sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression majoritaire dans le système nerveux, et dans lequel le gène E1 et au moins un des gènes E2, E4, L1-L5 est non fonctionnel.

5 Les adénovirus défectifs selon l'invention sont des adénovirus incapables de se répliquer de façon autonome dans la cellule cible. Généralement, le génome des adénovirus défectifs utilisés dans le cadre de la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la réPLICATION dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues 10 non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par la séquence d'ADN codant pour le BDNF.

Préférentiellement, le virus défectif de l'invention conserve les séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsidation des particules virales. Encore plus préférentiellement, comme indiqué ci-avant, le génome du virus recombinant défectif 15 selon l'invention comprend les séquences ITR, une séquence permettant l'encapsidation, le gène E1 non fonctionnel et au moins un des gènes E2, E4, L1-L5 non fonctionnel.

Il existe différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu. Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la 20 présente invention les adénovirus humains de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale (voir demande FR 93 05954). Parmi les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention on peut citer les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). De 25 préférence, l'adénovirus d'origine animale est un adénovirus canin, plus préférentiellement un adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. De préférence, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus d'origine humaine ou canine ou mixte.

30 Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par toute technique connue de l'homme du métier (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). En particulier, ils peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un adénovirus et un plasmide portant entre autre la séquence d'ADN codant pour le BDNF. La 35 recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits adénovirus et

plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit d préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de complémenter la partie du génome de l'adénovirus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %). Des stratégies de construction de vecteurs dérivés des adénovirus ont également été décrites dans les demandes n° FR 93 05954 et FR 93 08596 qui sont incorporées à la présente par référence.

Ensuite, les adénovirus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire, comme illustré dans les exemples.

Comme indiqué ci-dessus, la présente invention concerne également toute utilisation d'un adénovirus tel que décrit ci-dessus pour la préparation d'un composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des maladies neurodégénératives. Plus particulièrement, elle concerne toute utilisation de ces adénovirus pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention de la maladie de Parkinson, de la maladie d'Alzheimer, de la sclérose latérale amyotrophique (ALS), de la maladie d'Huntington, de l'épilepsie et de la démence vasculaire.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs tels que décrits précédemment. Ces compositions pharmaceutiques peuvent être formulées en vue d'administrations par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc. De préférence, les compositions pharmaceutiques de l'invention contiennent un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe dans le système nerveux du patient. Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. L'injection directe dans le système nerveux du patient est avantageuse car elle permet de concentrer l'effet thérapeutique au niveau des tissus affectés. L'injection directe dans le système nerveux central du patient est

avantageusement réalisée au moyen d'un appareil d'injection stéréotaxique. L'emploi d'un tel appareil permet en effet de cibler avec une grande précision le site d'injection.

A cet égard, l'invention concerne également une méthode de traitement des maladies neurodégénératives comprenant l'administration à un patient d'un adénovirus recombinant tel que défini ci-dessus. Plus particulièrement, l'invention concerne une méthode de traitement des maladies neurodégénératives comprenant l'administration stéréotaxique d'un adénovirus recombinant tel que défini ci-dessus.

Les doses d'adénovirus recombinant défectif utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les adénovirus recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, puis mesure, généralement après 48 heures, du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

Un autre objet de l'invention concerne toute cellule de mammifère infectée par un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs tels que décrits ci-dessus. Plus particulièrement, l'invention concerne toute population de cellules humaines infectée par ces adénovirus. Il peut s'agir en particulier de fibroblastes, myoblastes, hépatocytes, kératinocytes, cellules endothéliales, cellules gliales, etc.

Les cellules selon l'invention peuvent être issues de cultures primaires. Celles-ci peuvent être prélevées par toute technique connue de l'homme du métier, puis mises en culture dans des conditions permettant leur prolifération. S'agissant plus particulièrement de fibroblastes, ceux-ci peuvent être aisément obtenus à partir de biopsies, par exemple selon la technique décrite par Ham [Methods Cell.Biol. 21a (1980) 255]. Ces cellules peuvent être utilisées directement pour l'infection par les adénovirus, ou conservées, par exemple par congélation, pour l'établissement de banques autologues, en vue d'une utilisation ultérieure. Les cellules selon l'invention peuvent également être des cultures secondaires, obtenues par exemple à partir de banques préétablies.

Les cellules en culture sont ensuite infectées par des adénovirus recombinants, pour leur conférer la capacité de produire du BDNF. L'infection est

- réalisée *in-vitro* selon des techniques connues de l'homme du métier. En particulier, selon le type de cellules utilisé et le nombre de copies de virus par cellule désiré, l'homme du métier peut adapter la multiplicité d'infection et éventuellement le nombre de cycles d'infection réalisé. Il est bien entendu que ces étapes doivent être effectuées dans des conditions de stérilité appropriées lorsque les cellules sont destinées à une administration *in vivo*. Les doses d'adénovirus recombinant utilisées pour l'infection des cellules peuvent être adaptées par l'homme du métier selon le but recherché. Les conditions décrites ci-dessus pour l'administration *in vivo* peuvent être appliquées à l'infection *in vitro*.
- Un autre objet de l'invention concerne un implant comprenant des cellules mammifère infectées par un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs telles que décrites ci-dessus, et une matrice extracellulaire. Préférentiellement, les implants selon l'invention comprennent 10^5 à 10^{10} cellules. Plus préférentiellement, ils en comprennent 10^6 à 10^8 .

Plus particulièrement, dans les implants de l'invention, la matrice extracellulaire comprend un composé gélifiant et éventuellement un support permettant l'ancre des cellules.

Pour la préparation des implants selon l'invention, différents types de gélifiants peuvent être employés. Les gélifiants sont utilisés pour l'inclusion des cellules dans une matrice ayant la constitution d'un gel, et pour favoriser l'ancre des cellules sur le support, le cas échéant. Différents agents d'adhésion cellulaire peuvent donc être utilisés comme gélifiants, tels que notamment le collagène, la gélatine, les glycosaminoglycans, la fibronectine, les lectines, etc. De préférence, on utilise dans le cadre de la présente invention du collagène. Il peut s'agir de collagène d'origine humaine, bovine ou murine. Plus préférentiellement, on utilise du collagène de type I.

Comme indiqué ci-dessus, les compositions selon l'invention comprennent avantageusement un support permettant l'ancre des cellules. Le terme ancre désigne toute forme d'interaction biologique et/ou chimique et/ou physique entraînant l'adhésion et/ou la fixation des cellules sur le support. Par ailleurs, les cellules peuvent soit recouvrir le support utilisé, soit pénétrer à l'intérieur de ce support, soit les deux. On préfère utiliser dans le cadre de l'invention un support solide, non toxique et/ou bio-compatible. En particulier, on peut utiliser des fibres de polytétrafluoroéthylène (PTFE) ou un support d'origine biologique.

Les implants selon l'invention peuvent être implantés en différents sites de l'organisme. En particulier, l'implantation peut être effectuée au niveau de la cavité péritonéale, dans le tissu sous-cutané (région sus-pubienne, fosses iliaques ou inguinales, etc), dans un organe, un muscle, une tumeur, le système nerveux central, 5 ou encore sous une muqueuse. Les implants selon l'invention sont particulièrement avantageux en ce sens qu'ils permettent de contrôler la libération du produit thérapeutique dans l'organisme : Celle-ci est tout d'abord déterminée par la multiplicité d'infection et par le nombre de cellules implantées. Ensuite, la libération peut être contrôlée soit par le retrait de l'implant, ce qui arrête définitivement le 10 traitement, soit par l'utilisation de systèmes d'expression régulable, permettant d'induire ou de réprimer l'expression des gènes thérapeutiques.

La présente invention offre ainsi un moyen très efficace pour le traitement ou la prévention des maladies neurodégénératives. Elle est tout particulièrement 15 adaptée au traitement des maladies d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington, et de l'ALS. Les vecteurs adénoviraux selon l'invention présentent en outre des avantages importants, liés notamment à leur très haute efficacité d'infection des cellules nerveuses, permettant de réaliser des infections à partir de faibles volumes de suspension virale. De plus, l'infection par les adénovirus de l'invention est très 20 localisée au site d'injection, ce qui évite les risques de diffusion aux structures cérébrales voisines.

En outre, ce traitement peut concerner aussi bien l'homme que tout animal tel que les ovins, les bovins, les animaux domestiques (chiens, chats, etc), les chevaux, les poissons, etc.

25 La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Légende des figures

Figure 1 : Représentation du vecteur pXL2244

Figure 2 : Représentation du vecteur pSh-Ad-BDNF

30 Techniques générales de biologie moléculaire

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césum, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la

purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

5 Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

10 Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

15 Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

20 La mutagénèse dirigée *in vitro* par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

25 L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Falona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

30 La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

Exemples

Exemple 1 : Construction du vecteur pSh-Ad-BDNF.

Cet exemple décrit la construction d'un vecteur comprenant une séquence d'ADN codant pour le BDNF sous le contrôle d'un promoteur constitué par le LTR du virus du sarcome de rous (LTR-RSV).

1.1. Vecteur de départ (pXL2244) : Le plasmide pXL2244 contient l'ADNc de
 5 l'ApoAI sous le contrôle du promoteur LTR du virus RSV, ainsi que des séquences de l'adénovirus Ad5 (figure 1). Il a été construit par insertion d'un fragment ClaI-EcoRV contenant l'ADNc codant pour la préproApoAI dans le vecteur pLTR RSV-Bgal (Stratford-Perricaudet et al., J. Clin. Invest. 90 (1992) 626), digéré par les mêmes enzymes.

10 1.2. Clonage d'un ADNc codant pour le prepro-BDNF. L'ADNc complet codant pour le prepro-BDNF de rat (790 pb) a été cloné à partir d'une banque d'ADN génomique de rat par la technique de PCR, en utilisant comme amorce les oligonucléotides suivants :

Oligonucléotide 5' : 5'-TTCATCGAATTCCACCAGGTGAGAAG-3'

15 Oligonucléotide 3' : 5'-AATATAATCTAGACAAACATAAATCC-3'

La région 5' de la séquence obtenue a ensuite été modifiée par insertion d'un site de restriction ClaI, 25 bases en amont de l'ATG. Ce site a été introduit par PCR au moyen des oligonucléotides suivants :

Oligonucléotide 5' : 5'-TAGCTTCATCGATTCCACCAG-3'

20 Oligonucléotide 3' : 5'-AATATAATCTAGACAAACATAAATCC-3'

La séquence ainsi obtenue a ensuite été sous-clonée dans le plasmide pCRII (Invitrogen) pour générer le plasmide pCRII-BDNF.

1.3. Construction du vecteur pSh-Ad-BDNF

25 Cet exemple décrit la construction du vecteur pSh-Ad-BDNF contenant la séquence codant pour le prepro-BDNF sous contrôle du LTR du virus RSV, ainsi que des séquences de l'adénovirus Ad5 permettant la recombinaison in vivo.

Le vecteur pCRII-BDNF a été digéré par les enzymes ClaI et KpnI, et le fragment de 0,85 kb résultant, contenant la séquence codant pour le prépro-BDNF a ensuite été isolé et purifié par électrophorèse sur un gel d'agarose LMP ("Low Melting Point"). Parallèlement, le vecteur pXL2244 a été digéré par les mêmes enzymes de restriction ClaI et KpnI, puis précipité après inactivation de ces dernières. Le vecteur linéaire résultant, préalablement isolé et purifié par électrophorèse sur un

gel d'agarose, et le fragment de 0,85 kb ont ensuite été ligaturés pour générer le vecteur pSh-Ad-BDNF (figure 2).

Exemple 2 : Construction du vecteur pSh-Ad-BDNFtag.

Cet exemple décrit la construction d'un second vecteur comprenant une séquence d'ADN de fusion codant pour le BDNF sous le contrôle d'un promoteur constitué par le LTR du virus du sarcome de rous (LTR-RSV).

10 2.1. Génération de l'ADN de fusion : Dans cet exemple, une forme alternative de la séquence d'ADN codant pour le prépro-BDNF a été construite. Cette forme a été obtenue par insertion, à l'extrémité 3' terminale de la séquence décrite dans l'exemple 1.2., d'une séquence codant pour un épitope de sept acides aminés (tag) reconnu par un anticorps disponible commercialement (IBI, Integra Biosciences, Eaubonne, France). La séquence de la région ainsi fusionnée est la suivante :

La séquence ainsi obtenue a ensuite été sous-clonée dans le plasmide pCRII (Invitrogen) pour générer le plasmide pCRII-BDNFtag.

2.2. Construction du vecteur pSh-Ad-BDNFtag

Cet exemple décrit la construction du vecteur pSh-Ad-BDNFtag contenant la séquence de fusion codant pour le prepro-BDNF sous contrôle du LTR du virus RSV, ainsi que des séquences de l'adénovirus Ad5 permettant la recombinaison *in vivo*.

Le vecteur pCRII-BDNFtag a été digéré par les enzymes ClaI et KpnI, et le fragment de 0,87 kb résultant, contenant la séquence codant pour le prépro-BDNFtag a ensuite été isolé et purifié par électrophorèse sur un gel d'agarose LMP ("Low Melting Point"). Parallèlement, le vecteur pXL2244 (exemple 1.1.) a été digéré par les mêmes enzymes de restriction ClaI et KpnI, puis précipité après inactivation de ces dernières. Le vecteur linéaire résultant, préalablement isolé et purifié par

électrophorèse sur un gel d'agarose, et le fragment de 0,87 kb ont ensuite été ligaturés pour générer le vecteur pSh-Ad-BDNFtag.

Exemple 3. Fonctionnalité des vecteurs pSh-Ad-BDNF et pSh-Ad-BDNFtag

5 La capacité des vecteurs pSh-Ad-BDNF et pSh-Ad-BDNFtag à exprimer sur culture cellulaire une forme biologiquement active du BDNF a été démontrée par transfection transitoire de cellules COS1. Pour cela, les cellules (2.10^6 cellules par boîte de 10 cm de diamètre) ont été transfectées (8 µg de vecteur) en présence de Transfectam. Après 48 heures, le surnageant de culture des cellules a été récolté. Des
10 dilutions sérielles (1/200 et 1/50) de ce surnageant ont ensuite été ajoutées à des cultures primaires de neurones du septum (Hefti et al. In Dissection and Tissue cultures : Manual of the Nervous System (1989) 172, Alan R. Liss, Inc). L'effet trophique (survie cellulaire et poussée neuritique) sur ces cultures a été observé après coloration, et l'effet différentiateur par dosage de l'expression de l'enzyme choline
15 acétyl transférase (ChAT), selon la technique décrite par Fonnum (J. Neurochem. 24 (1975) 407).

Exemple 4. Construction des adénovirus recombinants contenant une séquence codant pour le BDNF

4.1. Construction de l'adénovirus Ad-BDNF

20 Le vecteur pSh-Ad-BDNF a été linéarisé et cotransfектé avec un vecteur adénoviral déficient, dans les cellules helper (ligne 293) apportant en *trans* les fonctions codées par les régions E1 (E1A et E1B) d'adénovirus.

Plus précisément, l'adénovirus Ad-BDNF a été obtenu par recombinaison homologue *in vivo* entre l'adénovirus mutant Ad-dl1324 (Thimmappaya et al., Cell 31 (1982) 543) et le vecteur pSh-Ad-BDNF, selon le protocole suivant : le plasmide pSh-Ad-BDNF et l'adénovirus Ad-dl1324, linéarisé par l'enzyme ClaI, ont été co-transfектés dans la ligne 293 en présence de phosphate de calcium, pour permettre la recombinaison homologue. Les adénovirus recombinants ainsi générés ont été sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'ADN de l'adénovirus recombinant a été amplifié dans la ligne cellulaire 293, ce qui conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus défectif recombinant non purifié ayant un titre d'environ 10^{10} pfu/ml.

LES particules virales sont ensuite purifiées par centrifugation sur gradient de chlorure de césum selon les techniques connues (voir notamment Graham et al., Virology 52 (1973) 456). L'adénovirus Ad-BDNF peut être conservé à -80°C dans 20 % de glycérol.

5

4.2. Construction de l'adénovirus Ad-BDNFtag

L'adénovirus Ad-BDNFtag a été construit selon le même protocole que l'adénovirus Ad-BDNF, mais en utilisant comme vecteur de départ le vecteur pSh-
10 Ad-BDNFtag.

Exemple 5. Fonctionnalité de l'adénovirus Ad-BDNF

La capacité de l'adénovirus Ad-BDNF à infecter des cellules en culture et à exprimer dans le milieu de culture une forme biologiquement active du BDNF a été démontrée par infection des lignées 293 humaine et PC12 de rat. La présence de
15 BDNF actif dans le surnageant de culture a ensuite été déterminée dans les mêmes conditions que dans l'exemple 3.

Ces études permettent de montrer que l'adénovirus exprime bien une form biologiquement active du BDNF en culture cellulaire.

Exemple 6 : Transfert *in vivo* du gène BDNF par un adénovirus recombinant à des rats présentant une lésion du fimbria-fornix 20

Cet exemple décrit le transfert du gène BDNF *in vivo* au moyen d'un vecteur adénoviral selon l'invention. Il montre sur un modèle animal de la lésion du fimbria-fornix, que les vecteurs de l'invention permettent d'induire l'expression *in vivo* de quantités thérapeutiques de BDNF.

Sur des rats préalablement anesthésiés, la voie septo-hippocampique (fimbria-fornix) a été sectionnée au niveau de l'hémisphère gauche. Cette lésion mécanique a été réalisée à l'aide d'un couteau chirurgical rétractable. Les coordonnées stéréotaxiques utilisées à cet effet sont, par rapport au bregma : AP : -1,7; ML : +1,5;
25 V : -5,5 à -0,5.

30 L'adénovirus recombinant BDNF a été injecté immédiatement après la lésion, dans le noyau médian du septum et dans la partie dorsale de l'hippocampe

déafférenté (hippocampe du côté de la lésion). Plus particulièrement, l'adénovirus injecté est l'adénovirus Ad-BDNF préparé dans l'exemple 4.1., utilisé sous forme purifiée ($3,5 \cdot 10^6$ pfu/ μ l), dans une solution saline phosphate (PBS).

5 Les injections sont réalisées à l'aide d'une canule (diamètre extérieur 280 μ m) connectée à une pompe. La vitesse d'injection est fixée à 0,5 μ l/min, après quoi, la canule reste en place pendant 4 minutes supplémentaires avant d'être remontée. Les volumes d'injection dans l'hippocampe et le septum sont respectivement 3 μ l et 2 μ l. La concentration d'adénovirus injectée est de $3,5 \cdot 10^6$ pfu/ μ l.

10 Pour l'injection dans l'hippocampe, les coordonnées stéréotaxiques sont les suivantes : AP=-4; ML=3,5; V=-3,1 (les coordonnées AP et ML sont déterminées par rapport au bregma, la coordonnée V par rapport à la surface de l'os crânien au niveau du bregma).

15 Pour l'injection dans le septum, les coordonnées stéréotaxiques sont les suivantes : AP=1; ML=1; V=-6 (les coordonnées AP et ML sont déterminées par rapport au bregma, la coordonnée V par rapport à la surface de l'os crânien au niveau du bregma. Dans cette condition, la canule présente un angle de 9 degrés par rapport à la verticale (dans le sens médio-latéral) afin d'éviter le sinus veineux médian.

20 Les effets thérapeutiques de l'administration de l'adénovirus selon l'invention ont été mis en évidence par trois types d'analyse : une analyse histologique et immunohistochimique, une analyse quantitative et une analyse comportementale.

Analyse histologique et immunohistochimique

25 La lésion mécanique du fimbria-fornix induit une perte de neurones cholinergiques (révélée en immunohistologie par un anticorps anti-choline acétyl transférase, ChAT) dans le septum médian, ainsi que la dénervation cholinergique dans l'hippocampe (détectée en histochimie par l'activité de l'acétyl choline estérase, AChE).

30 L'analyse histologique des cerveaux injectés est réalisée 3 semaines après l'injection intracérébrale de l'adénovirus Ad-BDNF. Pour cela, les animaux sont sacrifiés, sous anesthésie, par perfusion intracardiaque de 4% paraformaldéhyde. Après prélèvement, post-fixation et cryoprotection, le cerveau est coupé au cryomate selon le plan coronal : des coupes séries coronales de 30 μ m d'épaisseur sont

réalisées sur toute la longueur du septum médian et aux niveaux antérieur, médian et postérieur de l'hippocampe. Pour le septum médian, des coupes espacées de 180 µm (1 coupe sur 6) sont colorées au crésyl violet (pour évaluer la densité neuronale) et immunomarquées par un anticorps anti ChAT (Biochem) (pour identifier les neurones cholinergiques). La méthode immunohistochimique est celle de la streptavidine-biotine peroxydase révélée par la DAB. Pour l'hippocampe, des coupes espacées de 180 µm sont colorées selon la méthode histochimique pour l'AChE (acétyl choline estérase) afin de détecter l'innervation cholinergique. Les coupes sont montées sur lames de verre.

10 **Analyse quantitative**

Le nombre de neurones cholinergiques (ChAT positifs) dans le septum médian est le paramètre d'évaluation des effets de l'adénovirus Ad-BDNF. Le dénombrement est réalisé sur un échantillon (1 coupe sur 6 sur toute la longueur du septum médian). Pour chaque coupe, les neurones ChAT positifs sont dénombrés séparément des 2 cotés du septum. Les résultats cumulés pour toutes les coupes sont exprimés par le rapport du nombre de neurones ChAT positifs du côté lésé sur le nombre de neurones ChAT positifs du côté non lésé.

Analyse comportementale

Il est connu qu'une lésion bilatérale de la voie septo-hippocampique conduit à des déficits mnésiques. Afin d'évaluer les effets fonctionnels protecteurs d'une injection d'adénovirus Ad-BDNF sur ce type de lésion, les performances mnésiques des animaux sont analysées au cours de 2 tests comportementaux : le test de la piscine de Morris (mémoire de référence visuo-spatiale) et le test TMTT ("two-trials memory task"; "mémoire à court-terme d'un environnement nouveau").

25 **Exemple 7 : Transfert in vivo du gène BDNF par un adénovirus recombinant à des rats présentant une lésion de la voie nigro-striée**

Cet exemple décrit le transfert du gène BDNF *in vivo* au moyen d'un vecteur adénoviral selon l'invention. Il montre sur un modèle animal de la lésion de la voie nigro-striée, que les vecteurs de l'invention permettent d'induire l'expression *in vivo* de quantités thérapeutiques de BDNF.

Sur des rats préalablement anesthésiés, la voie nigro-striée a été lésée au niveau du faisceau mésencéphalique médian (MFB) par injection de la toxine 6-hydroxy dopamine (6OH-DA). Cette lésion chimique par injection a été unilatérale, suivant les coordonnées stéréotaxiques suivantes : AP : 0 et -1; ML : +1,6; V : -8,6 et -9 (les coordonnées AP et ML sont déterminées par rapport au bregma, la coordonnée V par rapport à la dure-mère). La barre d'incisive est fixée au niveau +5 mm.

L'adénovirus recombinant BDNF a été injecté immédiatement après la lésion, dans la substance noire et le striatum, du côté de la lésion. Plus particulièrement, l'adénovirus injecté est l'adénovirus Ad-BDNF préparé dans l'exemple 4.1., utilisé sous forme purifiée ($3,5 \cdot 10^6$ pfu/ μ l), dans une solution saline phosphate (PBS).

Les injections ont été réalisées à l'aide d'une canule (diamètre extérieur 280 μ m) connectée à une pompe. La vitesse d'injection est fixée à 0,5 μ l/min, après quoi, la canule reste en place pendant 4 minutes supplémentaires avant d'être remontée. Les volumes d'injection dans le striatum et la substance noire sont respectivement 2x3 μ l et 2 μ l. La concentration d'adénovirus injectée est de $3,5 \cdot 10^6$ pfu/ μ l.

Pour l'injection dans la substance noire, les coordonnées stéréotaxiques sont les suivantes : AP=-5,8; ML=+2; V=-7,5 (les coordonnées AP et ML sont déterminées par rapport au bregma, la coordonnée V par rapport à la dure-mère).

Pour les injections dans le striatum, les coordonnées stéréotaxiques sont les suivantes : AP=+0,5 et -0,5; ML=3; V=-5,5 (les coordonnées AP et ML sont déterminées par rapport au bregma, la coordonnée V par rapport à la dure-mère).

Les effets thérapeutiques de l'administration de l'adénovirus selon l'invention ont été mis en évidence par trois types d'analyse : une analyse histologique et immunohistochimique, une analyse quantitative et une analyse comportementale.

Analyse histologique et immunohistochimique

La lésion chimique de la voie nigro-striée induit une perte neuronale dans la substance noire ainsi que la dénervation dopaminergique dans le striatum (révélées en immunohistologie par un anticorps anti-tyrosine hydroxylase, TH).

- 5 L'analyse histologique des cerveaux injectés est réalisée 3 semaines après l'injection intracérébrale de l'adénovirus Ad-BDNF dans les conditions décrites dans l'exemple 6. Les coupes séries coronales de 30 µm d'épaisseur sont réalisées dans la substance noire et le striatum. Des coupes espacées de 180 µm (1 coupe sur 6) sont colorées au crésylique violet (pour évaluer la densité neuronale) et immunomarquées par
 10 un anticorps anti tyrosine hydroxylase (TH) (pour détecter les neurones dopaminergiques dans la substance noire et leur innervation dans le striatum).

Analyse quantitative

- Le nombre de neurones dopaminergiques (TH positifs), dans la substance noire est le paramètre d'évaluation des effets de l'adénovirus Ad-BDNF. Le dénombrement est réalisé sur un échantillon (1 coupe sur 6 sur toute la longueur de la substance noire). Pour chaque coupe, les neurones TH positifs sont dénombrés séparément des 2 cotés de la substance noire. Les résultats cumulés pour toutes les coupes sont exprimés en proportion : nombre de neurones TH positifs du côté lésé par rapport au nombre de neurones TH positifs du côté non lésé.

20 **Analyse comportementale**

- Afin d'évaluer les effets fonctionnels protecteurs d'une injection d'adénovirus Ad-BDNF sur la lésion de la voie nigro-striée, les performances sensori-motrices des animaux sont analysées au cours de 2 tests comportementaux : le test de la rotation induite par des agonistes dopaminergiques (apomorphine, amphétamine et lévodopa),
 25 et le test de préhension ("paw-reaching").

Exemple 8 : Transfert *in vivo* du gène BDNF par un adénovirus recombinant à des rats présentant une lésion de la voie perforante

- Cet exemple décrit le transfert du gène BDNF *in vivo* au moyen d'un vecteur adénoviral selon l'invention. Il montre sur un modèle animal de la lésion de la voie perforante, que les vecteurs de l'invention permettent d'induire l'expression *in vivo* de quantités thérapeutiques de BDNF.

Sur des rats préalablement anesthésiés, la voie entorhino-hippocampique (voie perforante) a été sectionnée unilatéralement à l'aide d'un couteau chirurgical. Les coordonnées stéréotaxiques utilisées à cet effet sont, par rapport au lambda : AP : +0,75; ML : +4,1 à 6,6; V : -7,7 (coordonnée V déterminée par rapport à la dure-mère).

L'adénovirus recombinant BDNF est injecté immédiatement après la lésion, soit au niveau de la lésion, soit au niveau de l'hippocampe et du cortex entorhinal. Plus particulièrement, l'adénovirus injecté est l'adénovirus Ad-BDNF préparé dans l'exemple 4.1., utilisé sous forme purifiée ($3,5 \cdot 10^6$ pfu/ μ l), dans une solution saline phosphate (PBS).

Les injections ont été réalisées à l'aide d'une canule (diamètre extérieur 280 μ m) connectée à une pompe. La vitesse d'injection est fixée à 0,5 μ l/min, après quoi, la canule reste en place pendant 4 minutes supplémentaires avant d'être remontée. Les volumes d'injection dans l'hippocampe, le cortex entorhinal et le site de lésion de la voie perforante sont respectivement 3 μ l, 2 μ l et 2 μ l. La concentration d'adénovirus injectée est de $3,5 \cdot 10^6$ pfu/ μ l.

Les effets thérapeutiques de l'administration de l'adénovirus selon l'invention peuvent être mis en évidence par une analyse comportementale dans les conditions de l'exemple 6.

REVENDICATIONS

1. Adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADN codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) ou un dérivé de celui-ci.
2. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que la séquence d'ADN code pour le prépro-BDNF.
3. Adénovirus selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est une séquence d'ADNc.
4. Adénovirus selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est une séquence d'ADNg.
- 10 5. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que la séquence d'ADN code pour le prépro-BDNF humain.
6. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans les cellules nerveuses.
- 15 7. Adénovirus selon la revendication 6 caractérisé en ce que les signaux d'expression sont choisis parmi les promoteurs viraux, de préférence parmi les promoteurs E1A, MLP, CMV et LTR-RSV.
8. Adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNc codant pour le prépro-BDNF humain sous le contrôle du promoteur LTR-RSV.
- 20 9. Adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNg codant pour le prépro-BDNF humain sous le contrôle du promoteur LTR-RSV.
10. Adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADN codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau humain (hBDNF) ou un dérivé de celui-ci sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression majoritaire dans les cellules nerveuses.
- 25 11. Adénovirus recombinant défectif selon la revendication 10 caractérisé en ce que le promoteur est choisi parmi le promoteur de l'énoïlase neurone spécifique et le promoteur de la GFAP.

12. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 11 caractérisé en ce qu'il est dépourvu des régions de son génome qui sont nécessaires à sa réPLICATION dans la cellule cible.
13. Adénovirus selon la revendication 12 caractérisé en ce qu'il comprend les ITR et une séquence permettant l'encapsidation, et dans lequel le gène E1 et au moins un des gènes E2, E4, L1-L5 sont non fonctionnels.
14. Adénovirus selon la revendication 12 ou 13 caractérisé en ce qu'il sagit d'un adénovirus humain de type Ad 2 ou Ad 5 ou canin de type CAV-2.
15. Utilisation d'un adénovirus selon l'une des revendications 1 à 14 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des maladies neurodégénératives.
16. Utilisation selon la revendication 15 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention de la maladie de Parkinson, d'Alzheimer, de Huntington ou de l'ALS.
17. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs selon l'une des revendications 1 à 14.
18. Composition pharmaceutique selon la revendication 17 caractérisée en ce qu'elle est sous forme injectable.
19. Composition pharmaceutique selon la revendication 17 ou 18 caractérisée en ce qu'elle comprend entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml adénovirus recombinants défectifs.
20. Cellule de mammifère infectée par un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs selon l'une des revendications 1 à 14.
21. Cellule selon la revendication 20 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule humaine.
22. Cellule selon la revendication 20 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule humaine de type fibroblaste, myoblaste, hépatocyte, cellule endothéliale, cellule gliale ou kératynocyte.

23. Implant comprenant des cellules infectées selon les revendications 20 à 22 et une matrice extracellulaire.
24. Implant selon la revendication 23 caractérisé en ce que la matrice extracellulaire comprend un composé gélifiant choisi de préférence parmi le collagène, la gélatine, les glucosaminoglycans, la fibronectine et les lectines.
25. Implant selon les revendications 23 ou 24 caractérisé en ce que la matrice extracellulaire comprend également un support permettant l'ancrage des cellules infectées.
26. Implant selon la revendication 25 caractérisé en ce que le support est constitué préférentiellement par des fibres de polytétrafluoroéthylène.

ORIGINAL

1/2

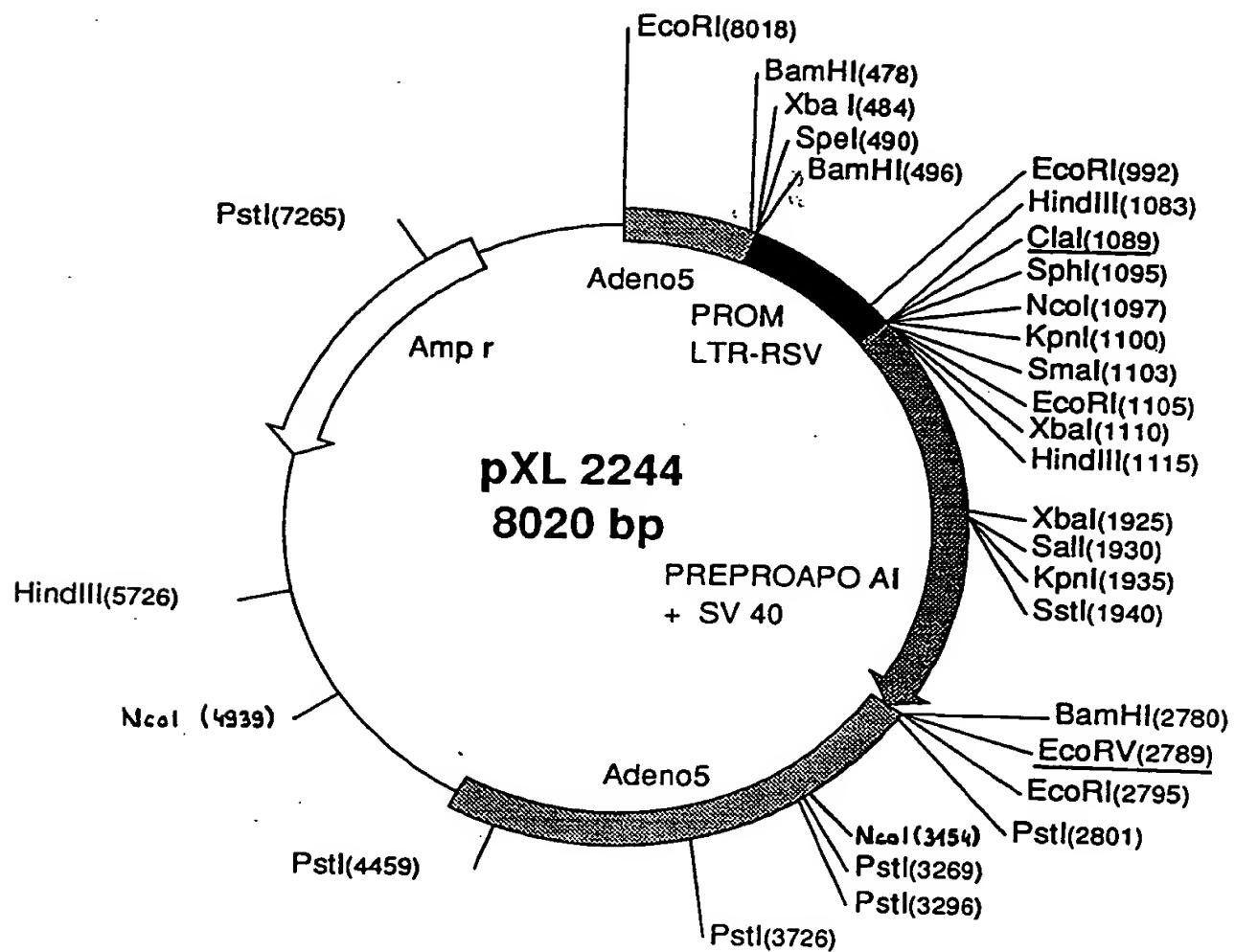


Figure 1

ORIGINAL

2/2

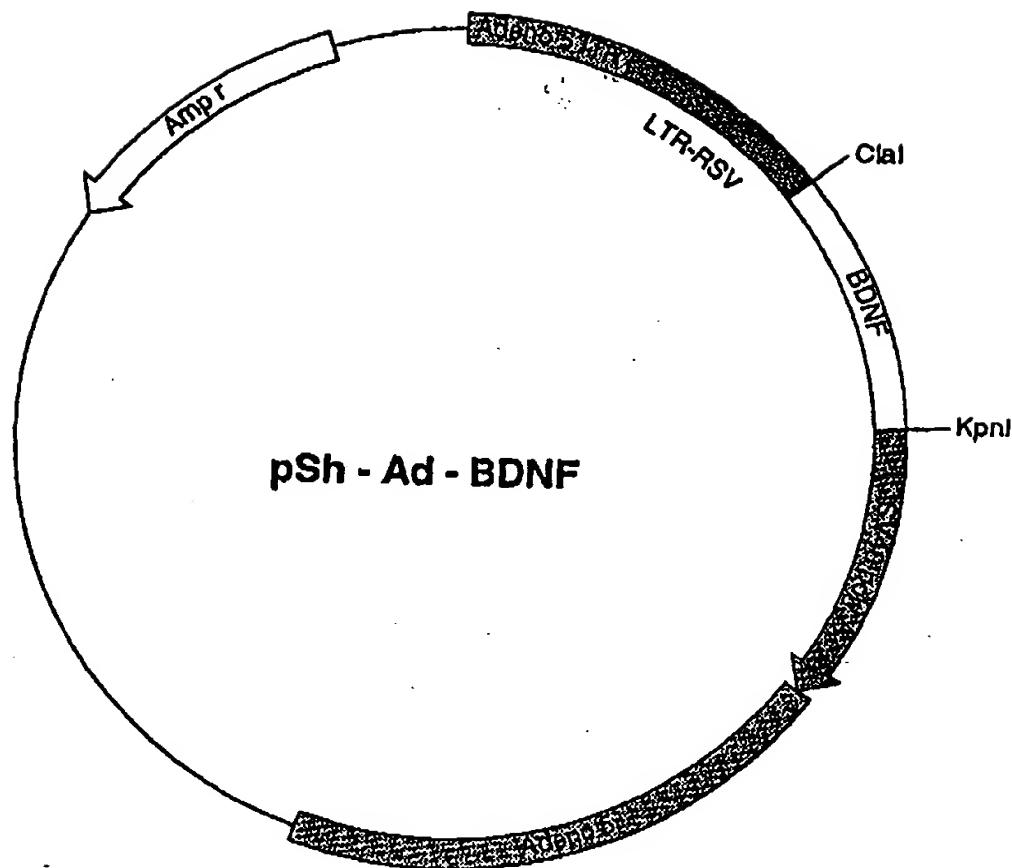


FIGURE 2

